

발정주기에 따른 생쥐 자궁내막조직의 알칼리성 Phosphatase 활성부위에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 의학과
김 성 예

한양대학교 자연과학대학 생물학과
김 문 규

= Abstract =

A Study of Localization of Alkaline Phosphatase Activity in Endometrium of Mouse Uterus During Estrous Cycle

Sung Rye Kim

College of Medicine, Ewha Womans University

Moon Kyoo Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University

This study has been done in order to verify the localization of alkaline phosphatase(ALP) activity, in connection with the mechanism of secretion and absorption of luminal fluid in the mouse uterus during estrous cycle. The localization of ALP has been carried out by using a modified Ernst(1972)¹²⁾ method. The results of these experiments were as followings : The reaction product by ALP activity was localized in general at the luminal and glandular epithelia, and the wall of blood vessels of endometrium.

At diestrus stage, luminal surface and basal lamina of the epithelia showed a moderate reaction products by ALP activity. However, the intensity of ALP activity was not even according to the region.

As the cyclic stage transited from proestrus to estrus the reaction product at the basal lamina region and on the luminal surface, which showed a lot of well developed microvilli, appeared gradually heavier to be come maximum at estrus stage. It is implying that the most active transport of luminal fluid occurs at these region during estrus stage.

At metaestrus stage, the reactive product at the same sites as estrus stage appeared light with some symptoms of degeneration. Some of secretory cells on the luminal epithelium had mitochondria with dense granules in their matrix.

Therefore, from the above result it is strongly suggested that the changes in the localization and intensity of ALP activity on the luminal and glandular epithelia, and blood vessels might be closely correlated with the secretion and absorption of the luminal fluid in the uterus during estrous cycle.

서 론

포유동물의 자궁은 발정주기 동안 형태¹⁾나 기능면²⁾에서 주기적으로 변화가 활발하게 일어나는 동적인 기관이다. 임신이 이루어 질 경우에는 수정된 배아를 받아들여 착상시키고 새로운 생명체로 발생할 수 있는 환경여건을 갖추기 위하여 자궁 조직세포의 분화가 활발하게 일어나게 된다. 즉 자궁 내막조직의 분화는 초기 배아의 발생유도와 깊은 관련이 있으며, 특히 배아가 자궁 내막조직에 착상하기 위하여 배아와 내막조직간의 상호인식이 필수적인데³⁾, 이런 인식의 매개는 자궁내 특수단백질 성분에 의한 것⁴⁾⁵⁾이라고 주장되고 있다.

Yochim(1975)⁷⁾은 자궁 내막조직의 분화가 일어날 때 조직내 여러 효소들의 작용과 신진대사의 변화가 일어난다고 하였으며, Aitken(1977)⁸⁾은 초기 임신 기간에 착상을 위한 분화작용이 활발한 탈락막에서 alkaline phosphatase(ALP)의 활성이 증가되며, 동시에 단백질 합성도 증가되므로 ALP는 탈락막형성의 index 혹은 표지효소(marker enzyme)라고 하였다.

그 뿐 아니라 자궁 내막의 특수단백질 성분들은 혈청의 것과 비교해 보았을 때 active transport⁹⁾에 의하여 자궁 상피세포로부터 내강으로 분비 혹은 흡수된다고 생각된다. 그러므로 발정주기에 따른 자궁조직의 분화와 함께 자궁 내막의 흡수와 분비에 관련된 효소들의 활성과 존재부위를 연구하는 일은 매우 흥미있는 일이라고 생각된다.

이미 본인 등(1980)¹⁰⁾은 발정주기에 따라서 생쥐 자궁의 ALP와 transport ATPase의 활성변화를 관찰한 바 Mg^{++} -dependent phosphatase, transport ATPase 그리고 ALP는 생쥐 자궁 상피세포에서부터 내막을 분비하는 데에 밀접하게 관련되어 있으며, 특히 ALP가 그 주 종을 이루고 있다는 것을 관찰하였다. 또한 포유류의 착상 기작을 규명하려는 연구¹¹⁾의 일환에서 자궁내막조직을 자궁내강 상피세포

층과 기질층으로 분리하여서 각 층의 ALP의 활성을 측정하여 본 결과 estrogen과 progesterone의 분비양상에 따라 ALP의 활성이 다르게 나타나고 있어, 이 호르몬의 표적세포가 다르며 영향을 미치는 시기가 다르다는 것을 알 수 있었다.

위의 결과들에 비추어 볼 때 이효소들의 활성부위도 호르몬 분비양상에 따라 다를 것으로 사료된다. 그러므로 estrogen과 progesterone 분비가 다양한 발정주기동안 이들 효소의 활성부위를 조직화학적 방법으로 관찰함으로써 자궁 내막조직의 분화와 자궁내막의 분비 및 흡수 기작을 규명하는 기초자료를 얻고자 본 연구를 시도하였다.

실험재료 및 방법

1. 재 료

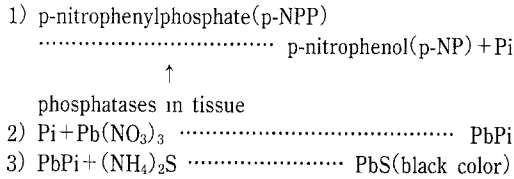
본 실험에 사용한 동물은 한양대학교 생물학과에서 사육한 생후 2~3개월된 생쥐(DDY strain)의 암컷으로 체중이(20±3)g인 것을 택하였다. 실험에 사용하기 전, 자궁질 도말법에 의하여 발정주기가 2회 이상 정상적으로 반복하는 생쥐를 발정간기(diestrus), 발정전기(proestrus), 발정기(estrus) 그리고 발정후기(metaestrus)등으로 판별한 후 경추과열로 도살하여 자궁을 적출하였다.

2. 방 법

위와같이 적출한 자궁은 생리식염수에서 혈액을 씻고 동일 시료로써 광학현미경 및 전자현미경 관찰을 동시에 할 수 있는 Ernst(1972)¹²⁾ 방법으로 처리하였다(Fig.-Text 1). 즉 조직은 2~3mm 크기로 절편을 만든 후 이 효소의 기질로서 p-nitrophenyl-phosphate(p-NPP, 5mM)를 포함하는 반응액(100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 20 mM SrCl₂)에 넣어 37°C 에서 60분간 반응시켰다.

그 후 0.2M sucrose가 포함된 0.1M Tris 완충용액으로 2번 흔들어서 씻은 다음 반응 생성물질(Pi)을

Fig. -Text 1. The main processes of histochemistry for localization of ALP.



고정하고 가시화(visualization) 하기 위하여 2% Pb(NO₃)₂ 용액에서 5분간 반응시키고 같은 완충액으로 3번 씻은 다음 다시 0.6% (NH₄)₂S로 3분 동안 반응시켜 착색시킨 후 0.1M Tris 완충용액에 1분간 흔들어서 씻었다.

이와같이 처리한 조직은 0.1M 인산 완충용액(pH 7.4) 내 3% glutaraldehyde로 2시간 전고정시킨 후 1% 오스늄산용액(OsO₄, Sigma)에 1시간 후고정하였다. 그 후 통상방법에 따라 ethylalcohol로 탈수하여 Epon 812 혼합액에 포매하였다.

광학현미경 관찰은 2μm 두께의 절편을 만들어 염색하지 않고 관찰하였고, 전자현미경 관찰은 1μm 두께로 잘라 1% toluidine blue(Merck)로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰부위를 선정하고 그 부위를 600~700Å 두께의 초박편으로 잘라 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중염색하여 전자현미경(ARI, Corinth 500)으로 관찰하였다.

결 과

발정주기에 따라 자궁 내막조직의 ALP의 활성부위를 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰한 결과들은 다음과 같았다.

1. 조직화학적 관찰 소견

자궁 내막조직의 ALP의 활성반응은 일반적으로 내강상피와 선상피 그리고 혈관에서 나타났다. 자궁이 가장 위축된 상태인 발정간기에서 내강상피층은 얇았으며, 그 기저층(basal lamina) 부위와 정단부위(apical region)에 활성반응이 나타났으며, 발달하지 않은 선상피는 기저층 부위에서만 약한 활성반응을 보였다(Fig. 1). 자궁조직이 증식되기 시작하는 발정전기에서 이르면, 내강상피층은 약간 두꺼워졌으며, 정단부위에서는 활성반응이 오히려 약하게 되었고 기저층 부위에서는 발정간기와 비슷하였다.

조금 발달한 선상피는 기저층 부위에 활성반응을 보였는데, 발정간기와 별차이가 없었다(Fig. 2). 자궁이 가장 크게 팽대되고 내강에 자궁액으로 충만되어 있는 발정기가 되면 내강상피층은 매우 두꺼워지고 선상피도 매우 발달하였는데, 이들 상피의 기저층 부위에서 강한 활성반응을 보였다(Fig. 3). 발정기가 지나 발정후기가 되면, 내막조직이 발정기와 별차이는 없었으나, 퇴화의 징후를 보이고 내강상피나 선상피에서 활성반응이 현저히 저하되어 있었다.

2. 미세구조 관찰 소견

발정간기에서 자궁 내강상피는 퇴화의 정도가 다른 여러 형태의 세포들로 혼합되어 있었다. 즉 핵내 heterochromatin(Hc)이 많이 응축되어 있는 세포와 세포질내에 분비과립 혹은 액포를 포함한 거의 괴사상태인 것 등이 관찰되었으며, 세포간격은 많이 떨어져 탈락하고 있는 것으로 보였다(Fig. 5). 선상피도 매우 위축되어 있었고 세포표면막에는 효소의 활성반응이 거의 없었다. 기저층 부위에는 콜라겐 섬유가 발달되어 있으며 약한 활성반응을 보였다(Fig. 6).

발정전기에서 자궁 내막세포의 증식이 활발한데 내강상피는 세포질내에 분비과립을 포함하고 있으며, 세포표면막에서는 약간의 세포질돌기가 있으나 활성반응은 약하게 나타났다. 선상피는 역시 기저막 부위에 약한 활성반응을 보였다(Fig. 7).

발정기에 이르면 자궁 내강상피와 선상피는 정단부위에 수많은 microvilli(Mv)가 발달하고 기저막 부위와 함께 강한 활성반응을 보였다(Fig. 9, 10). 세포질내에는 많은 분비과립을 내포하고 있었고 긴 원주상피세포들 사이에는 팽대된 물질(blister)을 형성하고 있어 분비작용의 극치를 이루고 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 8).

발정후기에서 내강상피는 일부에서 퇴화 징후로

보이는 상피세포가 더러 보였으며, 이 퇴화세포는 세포질내에 multivesicular body(Mb)를 포함하고 있으며, 약한 활성반응을 나타내었다(Fig. 11). 다른 일부의 내강 세포는 강한 활성반응을 보이면서 기질에 검은 과립(dense granule)이 있는 미토콘드리아를 내포하고 있었다(Fig. 12).

고 찰

포유동물의 자궁 내막조직의 분화에 미치는 난소 호르몬 즉 estrogen과 progesterone의 작용기작을 규명하려는 연구에서 본인등은 이들 호르몬의 표적 세포가 다르며¹¹⁾, 자궁 조직의 phosphatase 활성도가 성주기에 따라 변화하는 것을 관찰하였다¹⁰⁾. 그러므로 이들 호르몬 분비가 다양한 발정주기에 따라 ALP의 분포도 다를 것으로 생각되므로 이 효소의 활성부위를 조직화학적 방법으로 관찰하였다.

본 연구에서 자궁조직이 증식하기 시작하는 발정 전기에서 내강상피는 세포질내에 분비과립을 포함하고 있었으며 세포질돌기에는 활성반응이 거의 없었으며 선상피에서도 기저막 부위에 약한 활성반응을 보이고 있었는데, 이 시기는 estrogen 분비가 높아지기 시작하며 자궁의 조직분화가 활발하여 지기 시작하는 시기이므로 분비작용은 아직 일어나지 않고 phosphatase등을 포함한 분비물질이 세포질내에 합성되기 시작하는 것으로 여겨진다. 이와 같은 결과는 본인등의 연구¹⁰⁾에서 ALP활성도 역시 이시기에 높아지기 시작하였던 결과와, estrogen 호르몬의 영향으로 산성과 알칼리성 phosphatase의 합성이 증가되고¹³⁾, 단백질 합성 등 대사작용⁷⁾이 활발하여진다고 한 결과와 상응하는 결과이다.

또한 발정기에는 내강상피와 선상피가 발달되며 그 기저막 부위에 강한 활성을 나타내었다. 또한 정단부위에서 내강으로 향한 무수한 융모돌기가 있었으며, 이들 융모돌기에는 분비물로 둘러싸여진 enzyme coat가 관찰되었는데 이세포 주변에서도 강한 활성을 나타내었다. 이와 같은 분비현상과 강한 활성을 나타내는 것은 본인 등¹⁰⁾이 발정기에 자궁 내막이 증가되며 ALP활성이 증가되는 것을 관찰한 실험 결과와 일치되는 결과이다. 이와같은 결과는 estrogen의 표적세포는 역시 자궁 내강상피세포와 선상피층이라는 것¹¹⁾과 이 호르몬에 의해 선상피세

포에서 분비작용이 활발하게 나타났던 실험 결과¹⁴⁾와 일치되는 현상이다.

발정후기에서 내강상피 일부에서는 퇴화후로 보이는 상피세포가 더러 보였으며, 약한 활성반응을 나타내었고, 또 다른 일부에서는 강한 활성반응을 보이면서 기질에 검은 과립이 있는 미토콘드리아를 내포하는 등 여러형태의 세포들을 관찰할 수 있었는데, 이는 분화가 왕성하게 이루어졌던 상피세포층 일부가 퇴화해가며 탈락될 준비단계를 나타내는 시기가 되기 때문인 것으로 생각된다. 또한 강한 활성을 나타내는 세포에는 미토콘드리아가 많이 관찰되는데 이 시기는 progesterone 호르몬 분비가 왕성해지면서 자궁 내막 기질층 분화가 활발해지는 시기임으로 활성을 띤 미토콘드리아가 나타나는 것으로 생각된다.

자궁 내막조직이 가장 위축되며, 자궁 내강상피가 퇴화되기는 발정간기에는 핵과 세포질내에서도 역시 퇴화 현상을 나타내며, 위축된 선상피에서는 효소의 활성반응이 약하게 나타나고 있다. 이 시기는 estrogen과 progesterone 호르몬 분비가 최저가 되는 시기임으로 자궁 내막조직, 자궁 상피가 퇴화되는 현상을 나타내며, ALP 활성반응 역시 낮아진 것으로 여겨진다. 본인등¹⁰⁾의 연구결과에서도 이 시기에는 ALP활성 역시 낮게 측정되었다.

이상의 결과들로 미루어 보아 자궁내막은 발정주기에 따른 이 호소의 활성에 의한 능동수송으로 혈관, 상피세포, 그리고 자궁내강 간에 분비, 흡수되는 주기적 변화에 의하여 형성되는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 발정주기에 따라 생쥐의 자궁내 ALP의 활성부위를 Ernst(1972)의 방법을 변용하여 조사함으로써 자궁 내막의 분비와 흡수기전을 설명하고자 행하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

일반적으로 모든 시기에서 자궁 내강상피와 선상피, 그리고 혈관벽에서 ALP의 활성반응을 보였다. 발정간기에서는 자궁 내강상피 및 선상피의 기저층(basal lamina) 부위 그리고 내강상피의 정단부위(apical region)에서 강한 활성반응을 보였으며, 그 활성정도는 부위에 따라 일량하지는 않았다. 발정 전기를 거쳐 발정기로 진행되면서 점차 융모돌기가

발달하고 분비기능이 왕성해지고 활성반응도 점차 강하게 나타나 발정기에서 극치를 이루었다. 발정간기로 되돌아가면서 자궁 내강상피와 선상피가 점차 퇴화징후를 보이고 활성반응도 점차 약해졌다. 발정후기에서 분비세포는 기질내에 검은 과립을 포함한 미토콘드리아가 많이 관찰되었다.

위와 같은 결과로 보아 자궁 내강상피와 선상피, 그리고 혈관에 존재하는 ALP활성의 변화는 발정주기에 따라 자궁 내액의 분비와 흡수에 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

References

- 1) Nilsson O : *Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influence. 4. Uterine secretion. J Ultrastr Res* 1959 : 331-341
- 2) Lobel BL, Liliame Tic and Shelesnyak MC : *Studies on the mechanism of nidation. XVII Histochemical analysis on decidualization in the rat. Acta Endocrinol* 1965 : 50 : 452-468
- 3) Finn CA and Martin L : *Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to as decidual stimulus. Biol Reprod* 1972 : 7 : 82-86
- 4) Kao LWL and Bullock DW : *Rates of uteroglobin synthesis by endometrial explants from different days of early pregnancy in the rabbit. Biol Reprod* 1981 : 25 : 820-824
- 5) Komm BS, Rusling DJ and Lyttle CR : *Estrogen regulation of protein synthesis in the immature rat uterus : The analysis of proteins released into media during in vitro incubation* 1986 : 118 : 2411-2416
- 6) Jacob MH and Lyttle CR : *Uterine media proteins in the rat during gestation. Biol Reprod* 1987 : 36 : 157-165
- 7) Yochim JM : *Development of the progestational uterus : Metabolic aspects. Biol Reprod* 1975 : 12 : 106-133
- 8) Aitken RJ : *Changes in protein content of mouse uterine flushing normal pregnancy and delayed implantation and after ovariectomy and oestradiol administration. J Reprod Fert* 1977 : 50 : 29-36
- 9) Lawn AM : *The ultrastructure of the endometrium during the sexual cycle In : Adv. Reprod Physiol Edited by Bishop MWH 6th ed, London 1973 : pp61-97*
- 10) Kim MK, Kim SR and Cho WK : *Changes in phosphatase activity of the mouse uterus during the estrous cycle. Kor J Zool* 1980 : 23 : 61-68
- 11) Kim SR : *The effect of ovarian steroid hormones on the alkaline phosphatase activity in the luminal epithelia and stromal cells of early pregnancy rat uterus. J Kor Res Inst Better Living* 1986 : 37 : 183-193
- 12) Ernst SA : *Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. I Biochemical characterization of a cytochemical medium for the ultrastructural localization of a ouabain-sensitive, potassium-dependent phosphatase activity in the avian salt gland. J Histochem Cytochem* 1972 : 20 : 13-22
- 13) Henzel MR, Smith RE, Boost G and Tyler ET : *Lysosomal concept of menstrual bleeding in humans. J Clin Endocrinol Metab* 1972 : 34 : 860-875
- 14) Kim SR : *Ultrastructural and cytochemical studies on the uterine endometrial cells of rat at preimplantation stage. The Ewha Medical J* 1983 : 6 : 115-138

FIGURE LEGENDS

Abbreviations : CP : cytoplasmic process G : gland
 Hc : heterochromatin L : lumen
 Mb : multivesicular body Mv : microvilli
 SG : secretion granule M : mitochondria
 arrow : reaction product
 scale bars = 3 μ m

- Fig. 1~4. Microphotographs of the endometrium of the mouse uterus at the stages of diestrus (1)($\times 300$), proestrus(2)($\times 370$), estrus(3)($\times 370$) and metaestrus(4)($\times 370$), respectively, showing the reaction product of alkaline phosphatase.
- Fig. 5. Electron microphotograph of a portion of the luminal epithelium of the mouse uterus at diestrus stage. Note pyknotic and necrotic phases of epithelial cells.
- Fig. 6. Electron microphotograph of a portion of the glandular epithelium of the mouse uterus at diestrus stage, showing reaction product on the basal laminae.
- Fig. 7. Electron microphotograph of a portion of the luminal epithelium of the mouse uterus at proestrus stage, showing abundance of secretory granules.
- Fig. 8. Electron microphotograph of a portion of the luminal epithelium of the mouse uterus at estrus stage. Note the blisters in the intercellular space between epithelium cells.
- Fig. 9. Electron microphotograph of apical region of the luminal epithelium of the mouse uterus at estrus stage, Note the heavy reaction product on the surface of well developed microvilli.
- Fig. 10. Electron microphotograph of a portion of the glandular epithelium in the uterus at estrus stage, showing abundance of secretory granules and the heavy reaction product on the apical surface.
- Fig. 11. Electron microphotograph a portion of the luminal epithelium of the mouse uterus at metaestrus stage, showing little reaction product on smooth surface and a large multivesicular body.
- Fig. 12. Electron microphotograph a portion of the luminal epithelium, of the mouse uterus at metaestrus stage showing a cloud of mitochondria with dense granules in their matrix and the strong reaction product on the surface membrane.

